

Aus der Laboratoriumsgruppe für Mykologie und
bakteriologisch -serologische Diagnostik
des Robert Koch-Institutes Berlin
Leiter: Prof. Dr. med., Dr. med. vet. F. Staib

Über die Proteolyse bei *Candida albicans* und die antimyzetische Wirkung von Nystatin

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gudrun Altmann, geb. Grünh
aus Berlin

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550808_0006

Aus der Laboratoriumsgruppe für Mykologie und
bakteriologisch-serologische Diagnostik
des Robert Koch-Institutes Berlin

Leiter: Prof. Dr. med., Dr. med. vet. F. Staib

Über die Proteolyse bei *Candida albicans* und die antimyzetische Wirkung von Nystatin

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gudrun Altmann, geb. Grünh

aus Berlin

Referent: Prof.Dr.med.,Dr.med.vet. Friedrich S t a i b

Korreferent: Prof.Dr.med. Karl B a r t m a n n

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 21. 12. 1973

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
Problemstellung	2
II. Methodik	3
III. Ergebnisse	11
A. Eiweißfällung und Proteolyse im Serum-Protein-Agar pH 5,0 durch <u>Candida albicans</u>	11
B. Proteolyse-Kulturfiltrat von <u>C. albicans</u> ein Nährsubstrat für <u>C. albicans</u>	13
1. Wachstumsvergleich bei <u>C. albicans</u> im Proteolyse-Kulturfiltrat und in Sabouraud-Dextrose-Lösung	13
2. Chemische Analyse von Proteolyse-Kulturfiltrat mit Hilfe von <u>C. albicans</u> CBS 2730 gewonnen	14
C. Die Wirkung von Nystatin gegen <u>C. albicans</u> in flüssigen Nährmedien	22
1. Die Wirksamkeit von Nystatin gegen <u>C. albicans</u> in Sabouraud-Dextrose-Lösung (Ausgangs-pH 6,0) und in Proteolyse-Kulturfiltrat von <u>C. albicans</u> CBS 2730 (Ausgangs-pH 3,5) (Röhrchenverdünnungstest)	22
2. Die Wirksamkeit von Nystatin gegen <u>C. albicans</u> in Sabouraud-Dextrose-Lösung (Ausgangs-pH 3,5) und in Proteolyse-Kulturfiltrat von <u>C. albicans</u> CBS 2730 (Ausgangs-pH 3,5)	22
3. Die Wirksamkeit von Nystatin gegen <u>C. albicans</u> in Sabouraud-Dextrose-Lösung (Ausgangs-pH 6,0) und in Proteolyse-Kulturfiltrat von <u>C. albicans</u> CBS 2730 (Ausgangs-pH 6,0)	23
IV. Diskussion	30
V. Zusammenfassung	39
VI. Literaturverzeichnis	I-VI

I. Einleitung

Die Beurteilung der Therapie von Candida albicans Mykosen wird besonders erschwert durch die fakultative Pathogenität und das saprophytäre Vorkommen von C. albicans beim Menschen (37, 44, 53). Voraussetzung für die Stellungnahme zur Empfindlichkeit bzw. Therapieresistenz eines C. albicans Stammes ist im jeweiligen Fall seine einwandfreie Absicherung als Krankheitserreger.

Umfangreiche in vitro Untersuchungen an frisch isolierten C. albicans Stämmen ergaben eine einheitliche Empfindlichkeit gegen Nystatin bzw. Polyen-Antimycotica (47), was letztlich die Annahme des Fehlens einer Resistenz gegen diese Gruppe von Wirksubstanzen zur Folge hatte (3, 23, 33, 51, 55).

Das mögliche Fortbestehen eines C. albicans Befundes in klinischem Untersuchungsmaterial trotz optimaler Verabfolgung des Antimycoticums zwingt zur Klärung dieser Diskrepanz (45). Hierbei wird entweder die Effektivität der Verabreichung bezweifelt oder die Erregernatur in Frage gestellt, d.h. die klinische Symptomatik mit dem vorliegenden mikrobiologischen Befund nicht mehr in Zusammenhang gebracht (29).

Die Tatsache, daß u.a. die Aminosäure Cystein die Wirkung von Nystatin stört (8, 16, 22, 30, 32, 35, 55, 58, 59), führte zu der Frage, inwieweit derartige Substanzen in

Abhängigkeit von der Stoffwechsellage von C. albicans anfallen können (8, 55). Für die Untersuchung dieser Fragestellung bot sich die Proteolysefähigkeit der C. albicans in ganz besonderer Weise an (1, 2, 20, 26, 39, 40, 48, 50). Nachdem die Eiweißfällung und Lysis als mögliche Pathogenitätskriterien in zunehmendem Maße diskutiert werden (18, 43), interessiert insbesondere, inwieweit Proteolyseprodukte in der Lage sind, den Wirkungsablauf von einem Polyen-Antibioticum zu beeinflussen (44, 46, 50).

Problemstellung

Die Vorstellung, daß Proteolyseprodukte möglicherweise die Wirkung von Nystatin stören können, setzt voraus, daß die auf ihre Empfindlichkeit gegen Nystatin zu prüfenden Stämme über eine Proteolyseaktivität verfügen. Die vorliegenden Untersuchungen erstrecken sich deshalb über die Isolierung und Identifizierung von Stämmen aus klinischem Untersuchungsmaterial hinaus auf die Prüfung ihrer Proteolyseaktivität und letztlich auf die Wirkung von Nystatin unter den international üblichen Substratbedingungen im Vergleich zu der Wirkung in einem Nährmedium, das sich C. albicans durch eigene Proteolyse schafft.

II. Methodik

Geprüfte Stämme: Für die im folgenden durchgeführten Untersuchungen dienten 50 aus klinischem Untersuchungsmaterial frisch isolierte Stämme von C. albicans:

Sputum	32 Stämme
Hautabstrich	8 Stämme
Blut	5 Stämme
Vaginalabstrich	2 Stämme
Bronchialsekret	1 Stamm
Wundabstrich	1 Stamm
Stuhl	1 Stamm

Die Sproßpilzstämme wurden mit Hilfe von Sabouraud-Dextrose-Agar mit Zusätzen von Penicillin und Streptomycin isoliert, anschließend nach der Methode von LODDER und KREGER-VAN RIJ (25) identifiziert und mit Hilfe der Plattenmethode nach STAIB auf ihre Proteolyseaktivität geprüft (39, 40). Als Vergleichsstamm für die Beurteilung der Proteolyseaktivität von C. albicans diente der Stamm C. albicans CBS 2730, von dem die Protease rein dargestellt und charakterisiert wurde (13, 34).

Nährmedien:

a) Sabouraud-Dextrose-Agar:

Aqua dest. 1000 ml, Dextrose 40 g, Bacto-Pepton (Difco) 10 g, Agar 15 g; 20 Min. Dampftopf, an-

schließend 15 Min./110°C. Je nach Bedarf werden Chemo-therapeutica, wie hier zur erleichterten Isolierung von Sproßpilzen aus bakterienhaltigem Untersuchungsmaterial, zugesetzt. Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca. 50°C wurden z.B. Streptomycinsulfat (40 E/ml) und Penicillin G (20 E/ml) zugesetzt und das Ganze anschließend in Petrischalen gegossen.

b) Sabouraud-Dextrose-Lösung:

Herstellung wie Sabouraud-Dextrose-Agar, nur ohne Agar.

c) Serum-Protein-Agar pH 5,0:

Grundsubstrat: Dextrose 20 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,5 g, gewaschener Agar 20 g, Aqua dest. 1000 ml. Das Ganze 15 Min. bei 110°C autoklaviert, anschließend auf ca. 60°C abgekühlt und der pH-Wert mit 0,1-n-NaOH auf 5,0 eingeseht. Hiervon wurden 10 ml mit 2 ml einer 1 %igen sterilen Rinder-Albuminlösung (Behringwerke, Marburg/Lahn) und 0,025 ml Protovita (Deutsche Hoffmann-La Roche, Grenzach/Baden) als Wachstoffsquelle in einer Petrischale (Durchmesser 82 mm) gemischt. Der End-pH-Wert ist unter diesen Bedingungen 5,0. Der erstarrte Nährboden muß klar und durchsichtig sein (39, 40).

Nachweis der Proteolyse auf Serum-Protein-Agar pH 5,0:

Proteolysierende C. albicans Stämme zeigen auf oben beschriebenen Medium ab 2 Tagen/26°C stammspezifisch

1. Eiweißfällung, - sichtbar durch milchige Trübung des

Mediums -. 2. Proteolyse - wasserklare Aufhellung dieser Fällungsbereiche.-.

Der Ablauf der Proteolyse wird mittels Eiweißfärbung (Amidoschwarz) dieses bewachsenen Nährbodens kontrolliert (40).

Farblösung:

12,5 g Amidoschwarz 10 B (Fa. E. Merck, Darmstadt) in 1 l Methanol-Eisessiggemisch (9 Teile Methanol + 1 Teil Eisessig).

Entfärbelösung:

10,0 l Aqua dest., 1,5 l Eisessig, 0,5 l Phenol crist. (verflüssigt).

Färbung:

Die Platten werden mit der Amidoschwarzlösung überschichtet (Färbedauer 20 Min.).

Entfärbung:

Die Farblösung wird vorsichtig abgekippt und der angefärbte Nährboden anschließend mit der Entfärbelösung überschichtet, die in einem Zeitraum von 15 Std. dreimal erneuert wird (Petrischalen randvoll gefüllt).

Beurteilung:

Im Proteolysebereich der Kulturen ist eine Entfärbung eingetreten, weil kein anfärbbares Eiweiß mehr vorhanden ist.

d) Serum-Protein-Medium (flüssig):

Dextrose 2 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,5 g, Aqua dest. 1000 ml. Das Ganze 15 Min. bei 110°C autoklaviert. Der pH-Wert wurde mit 1-n-NaOH auf 5,0 eingestellt. Zu 100 ml einer 1 %igen Rinder-Albuminlösung wurden 1,25 ml Protovita als Wachstoffsquelle zugegeben, anschließend mittels Seitzfilter (EKS) (Fa. Seitz-Asbest-Werke, Bad Kreuznach) keimfrei filtriert und dem Basismedium im Verhältnis 1:6 zugesetzt. In 1000 ml fassende Erlenmeyerkolben wurden je 600 ml Serum-Protein-Medium (flüssig) abgefüllt (40).

e) Proteolyse-Kulturfiltrat:

Das oben beschriebene Nährmedium wurde (je 600 ml) mit $2,5 \times 10^6$ C. albicans Zellen (48 Std./ 26°C auf Sabouraud-Dextrose-Agar vorgezüchtet) beimpft, die in 0,05 ml einer 0,85 %igen NaCl-Lösung aufgeschwemmt waren. Die Bebrütung erfolgte im Schüttelwasserbad bei 26°C für 48-60 Std. Da der optimale pH-Bereich für die rein dargestellte Exoprotease von C. albicans CBS 2730 bei pH 3,2-3,5 liegt, wurde die Inkubation bei Erreichen des pH-Wertes 3,5 abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt ist das Kulturmedium milchig trüb (Keimdichte: etwa 2×10^8 koloniebildungsfähige Zellen/ml). Anschließend wurde

das Ganze mittels Seitzfilter (EKS) keimfrei filtriert und das klare Filtrat mit 1-n-NaOH auf den pH-Wert 6,0 eingestellt. Die pH-Messung erfolgte mit dem pH-Meter Typ 260 (Fa. Dr. W. Ingold, Frankfurt/Main). Die Filtrate wurden steril in Mengen zu je 4,5 ml in Reagenzgläser abgefüllt. Diese Proteolyse-Kulturfiltrate mit den Ausgangs-pH-Werten 3,5 und 6,0 dienten als Nährsubstrate für die Prüfung der Empfindlichkeit von C. albicans gegenüber Nystatin (Fa. Squibb, USA; zur Verfügung gestellt von der Vertriebsfirma Chemische Fabrik von Heyden GmbH., München), im Vergleich mit dem Wirkungsablauf in Sabouraud-Dextrose-Lösung (41, 46, 48).

Die Empfindlichkeitsprüfung bei C. albicans gegen Nystatin
im Röhrenverdünnungstest

Nystatin:

Im Jahre 1960 gelang die Isolierung von Nystatin aus dem Kulturfiltrat von Streptomyces noursei. Es handelt sich um ein amphoterer Tetraen mit einem Mycosaminanteil. Die Summenformel von Nystatin beträgt $C_{46-47}H_{73-75}O_{18}N$ mit einem Mol.-Gewicht von etwa 950. Nystatin ist ein weitgehend wasserunlösliches, gelbliches Pulver; löslich ist es gut in Dimethylformamid, das deshalb auch in vorliegender Arbeit als Lösungsmittel Verwendung fand. Nystatin wirkt fungistatisch, bei Erhöhung der Konzentration in Abhängigkeit von dem pH-Wert fungizid. Das Wirkungsoptimum liegt bei pH 4,5-6,5 und 25°C (55). Das internationale Standard-Präparat

(WHO) Nystatin enthält 3000 IE/mg. Eine IE Nystatin entspricht 0,333 γ (38, 55). Hinsichtlich weiterer chemischer, physikalischer und toxikologischer Eigenschaften von Nystatin sei auf Spezialliteratur verwiesen (11, 16, 38, 55).

a) Nystatinlösung:

Der Inhalt einer Ampulle mit 500.000 E Nystatin-Rein-
substanz wurde in 5 ml N-N-Dimethylformamid (Fa. E.
Merck, Darmstadt) auf 100.000 E/ml bzw. 10.000 E/ml
gelöst und mit Phosphatpuffer pH 6,0 auf folgende
Konzentrationen weiter verdünnt: 1000, 500, 250, 125,
62,5 E/ml. Die Endkonzentration betrug dann durch
Zusatz von 4,5 ml Nährboden 100, 50, 25, 12,5 und
6,25 E/ml.

Der Phosphatpuffer wurde wie von BOUDRU (3) für ent-
sprechende Untersuchungen empfohlen, hergestellt:
Aqua dest. 1000 ml, KH_2PO_4 8 g, K_2HPO_4 2 g; einge-
stellt auf pH 6,0, anschließend 15 Min./110°C auto-
klaviert.

b) Inokulum:

Für die Prüfung der Empfindlichkeit der 50 C. albicans
Stämme im Röhrchenverdünnungstest wurden die Stämme
48 Std./26°C auf Sabouraud-Dextrose-Agar vorgezüchtet
und in 0,85 % NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Es wurde dar-
auf geachtet, daß eine weitgehend gleiche Keimdichte
bei den einzelnen Kulturaufschwemmungen erreicht wurde.

Die endgültige Keimzahl wurde mit Hilfe der Plattenmethode bestimmt. Die Keimdichte betrug durchschnittlich ca. 10^8 vermehrungsfähige Zellen in 1 ml. Hiervon wurde 0,1 ml in jedes Röhrchen gegeben (diese Zelleinsaat wurde in Anlehnung an die Untersuchungen von BOUDRU (3) gewählt).

Durchführung des Röhrchenverdünnungstestes:

Von den zu vergleichenden Nährmedien (Proteolyse-Kulturfiltrat und Sabouraud-Dextrose-Lösung mit den AusgangspH-Werten 3,5 und 6,0) wurden je 4,5 ml in Reagenzgläser gegeben, und je 0,5 ml Nystatinlösung in den verschiedenen Konzentrationen (s. Nystatinlösung) hinzugefügt. Anschließend wurden diese Nährmedien mit je 0,1 ml der Kultur aufschwemmung (s. Inokulum) beimpft. Als Kontrollen dienten unbeimpfte und Nystatin-freie, beimpfte Nährmedien.

Der hinsichtlich seiner Proteaseausstattung enzymatisch charakterisierte C. albicans Stamm CBS 2730 (13, 34) diente bei sämtlichen Prüfungen als Kontrollstamm für die Beurteilung des Nährwertes von Proteolyse-Kulturfiltrat und für die Beurteilung der Empfindlichkeit gegen Nystatin unter den gewählten Substratbedingungen.

Das Ganze wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen/26°C belassen und nach 2 bzw. 4 Tagen makroskopisch beurteilt. Nach Entnahme je 1 Normalöse aus sämtlichen

Medien und Ausimpfung auf Sabouraud-Dextrose-Agar erfolgte die kulturelle Beurteilung des Wachstums nach 3 Tagen/26⁰C (s. Abb. 6).

III. Ergebnisse

A. Eiweißfällung und Proteolyse im Serum-Protein-Agar pH 5,0 durch *Candida albicans*

Die aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien isolierten 50 *C. albicans* Stämme verfügten im Agargel über die Fähigkeit, Eiweiß - hier Albumin - zu fällen. 48 Stämme zeigten nach abgelaufener Eiweißfällung Proteolyse, die mit Hilfe der Eiweißfärbung einwandfrei nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 2). Lediglich 2 Stämme *C. albicans* (M 243 und M 409), von der Haut und aus Sputum isoliert, zeigten keine Proteolyse.

Die Proteolyse sämtlicher 48 Stämme war durch runde, glattrandige Kolonien bzw. rund-ovale, sprossende Zellen, d.h. durch die Hefephase, verursacht. Nach 10-tägiger Beobachtungszeit befanden sich noch 15 Stämme in dieser morphologischen Zustandsform.

Innerhalb der Beobachtungszeit von 10 Tagen zeigten 33 Stämme nach abgelaufener Proteolyse eine morphologische Veränderung. Aus den bisher glattrandigen Kolonien erfolgte eine üppige Myzel- und Pseudomyzelbildung hinein in die proteolytierten Nährbodenbereiche (s. Abb. 3).

Die oben genannten 15 Stämme, die keine Tendenz zur Myzel- bzw. Pseudomyzelbildung nach abgelaufener Proteolyse zeigten, wurden aus Blut (1), Bronchialsekret (1), Sputum (9), Haut (2) isoliert.

Die übrigen 33 Stämme, die im Proteolysebereich in die Myzelphase übergingen, wurden aus Sputum (23), Haut (5), Blut (4), Genitalabstrich (2) und Stuhl (1) isoliert.

B. Proteolyse-Kulturfiltrat von C. albicans ein

Nährsubstrat für C. albicans

Für die durchzuführenden Untersuchungen war Voraussetzung, daß das Proteolyse-Kulturfiltrat ein mit herkömmlichen Nährböden vergleichbares Nährsubstrat für C. albicans ist. Über die Wachstumskontrolle im Röhrchenverdünnungstest unter Verwendung von Proteolyse-Kulturfiltrat ohne Nystatin-zusatz hinaus sollte anhand eines quantitativen Wachstumsvergleichs zwischen Proteolyse-Kulturfiltrat und Sabouraud-Dextrose-Lösung der noch vorhandene Nährwert des Proteolyse-Kulturfiltrats bestätigt werden.

1. Wachstumsvergleich bei C. albicans im Proteolyse-Kulturfiltrat und in Sabouraud-Dextrose-Lösung

Wie aus den Werten, die bei statischer Kultur erhalten wurden, hervorgeht (s. Tab. 2), ist das Proteolyse-Kulturfiltrat von C. albicans CBS 2730 ein der Sabouraud-Dextrose-Lösung weitgehend gleichwertiges Nährsubstrat. Die Lag-Phase für den Stamm C. albicans CBS 2730 betrug in beiden verschiedenen Medien ca. 5 Stunden. Des weiteren konnte belegt werden, daß die Wachstumsbedingungen bei pH 3,5 in beiden Medien günstiger sind.

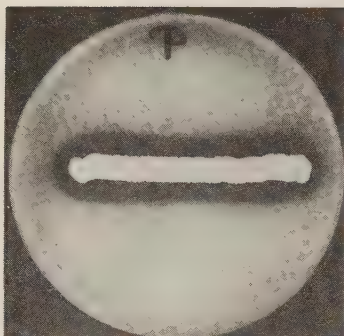
Da das Proteolyse-Kulturfiltrat einzelner Stämme in seinem Nährwert für bekannte C. albicans Stämme variieren kann, wurden die vorliegenden Untersuchungen nur mit dem Proteolyse-Kulturfiltrat von C. albicans CBS 2730 durch-

geführt. Eine Beurteilung der stammspezifischen Kulturfiltrate wird erst dann möglich sein, wenn eine einwandfreie chemische Analyse dieser Filtrate vollständig gelungen sein wird.

2. Chemische Analyse von Proteolyse-Kulturfiltrat
mit Hilfe von C. albicans CBS 2730 gewonnen

Das bei vorliegenden Untersuchungen benutzte Proteolyse-Kulturfiltrat enthielt ca. 200 Peptidverbindungen. Die Dextrose-konzentration betrug noch 0,8 %. Diese Analyse wurde von Herrn Prof. Dr. Dr. H. FASOLD, Direktor des Instituts für Biochemie der Universität, Frankfurt/Main, durchgeführt (12).

Abbildung 1



Proteolyse-Nachweis bei C. albicans
im Serum-Protein-Agar pH 5,0 (ungefärbt).
Stamm C. albicans M 162/71 isoliert
aus Sputum.

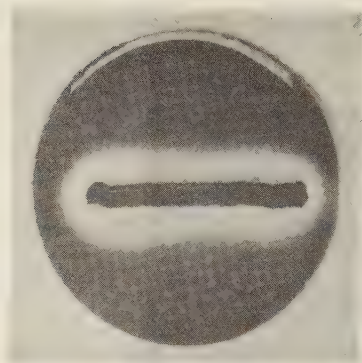
Im Bild: Kulturstreifen (Hefephase)
nach 10 Tagen/26°C.

Beachte: Aufklarungszone um den
Kulturstreifen (Proteolyse) dunkler
Hof. Milchige Trübung des übrigen
Nährbodens ist verursacht durch
Eiweißfällung.

Beweis der Proteolyse siehe hierzu
Abbildung 2.

Foto: Durchmesser der Petrischale 82 mm.

Abbildung 2



Proteolyse-Nachweis bei C. albicans
M 162/71 im Serum-Protein-Agar pH 5,0,
dargestellt mit Hilfe der Eiweißfärbung
unter Verwendung von Amidoschwarz.

Beachte: Im Proteolyse-Bereich um den
Kulturstreifen ist kein anfärbbares
Eiweiß mehr vorhanden.

Eigenschaften des Stammes M 162/71:

a) Aktivität gegen Eiweiß

Eiweißfällung nach 48 Std./26°C,

Proteolyse nach 120 Std./26°C.

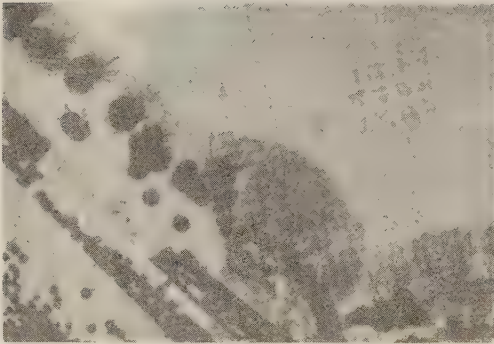
b) Empfindlichkeit gegen Nystatin (MHK)

In Sabouraud-Dextrose-Lösung Aus-
gangs-pH 3,5: 25 E/ml.

In Proteolyse-Kulturfiltrat Ausgangs-
pH 3,5: über 100 E/ml.

Foto: Durchmesser der Petrischale 82 mm.

Abbildung 3



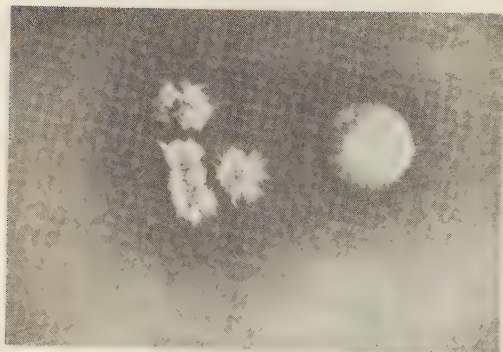
Dimorphismus bei C. albicans M 417, isoliert aus Sputum; im Verlaufe der Proteolyse in Serum-Protein-Agar pH 5,0 (nach Eiweißfärbung unter Verwendung von Amidoschwarz).

Im Bild: Ausbildung von Myzel und Pseudomyzel in die proteolysierten Nährbodenbereiche.

Beachte: Unverkennbar lag C. albicans hier eingangs (während der Proteolyse) in der Hefephase (glattrandige Kolonie) vor. Außer dem Kulturmateriail (schwarz gefärbt) ist kein anfärbbares Eiweiß im Agargel vorhanden. Siehe hierzu Abbildung 4.

Vergrößerung: x 8

Abbildung 4



Dimorphismus bei einzeln stehenden Kolonien von C. albicans K 417, isoliert aus Sputum; im Verlaufe der Proteolyse in Serum-Protein-Agar pH 5,0 (ungefärbt)!

Im Bild: Rund um die einzeln stehenden Kolonien Ausbildung von Myzel und Pseudomyzel in die proteolysierten Nährboden-Bereiche.

Legende: Der dunkle Bereich bedeutet Proteolyse; während der Ausbildung dieser Bereiche (bis ca. 5. Tag/26°C) lag C. albicans in Form glattrandiger Kolonien, d.h. rund-ovaler sprossender Zellen vor.

Vergrößerung: x 8

Tabelle 1a

Eiweißfällung und Proteolyse im Serum-Protein-Agar pH 5,0

durch C. albicans

(Gesamtbeobachtungszeit 10 Tage/26°C)

C.albicans Stamm Nr.	Herkunft der Stämme	Eiweiß- fällung	Proteolyse	Vorliegen von der Myzelphase bei C. albicans nach abgelaufener Proteolyse nach 10 Tagen
40	Sputum	+	+	+
62	Sputum	+	+	+
64	Sputum	+	+	-
178	Sputum	+	+	+
229	Sputum	+	+	-
243	Haut	+	-	-
256	Sputum	+	+	+
279	Haut	+	+	+
284	Sputum	+	+	-
285	Sputum	+	+	+
286	Blut	+	+	+
288	Sputum	+	+	+
289	Sputum	+	+	+
301	Sputum	+	+	-
310	Sputum	+	+	+
316	Sputum	+	+	-
321	Sputum	+	+	+
323	Haut	+	+	-
329	Haut	+	+	+
336	Vaginal- abstrich	+	+	+
338	Sputum	+	+	+
364	Sputum	+	+	-
376	Sputum	+	+	+
378	Sputum	+	+	+
380	Haut	+	+	-

Tabelle 1b

Eiweißfällung und Proteolyse im Serum-Protein-Agar pH 5,0

durch C. albicans

(Gesamtbeobachtungszeit 10 Tage/26°C)

C.albicans Stamm Nr.	Herkunft der Stämme	Eiweiß- fällung	Proteolyse	Vorliegen von der Myzelphase bei C.albicans nach abgelaufener Proteolyse nach 10 Tagen
388	Haut	+	+	+
393	Haut	+	+	+
394	Haut	+	+	-
400	Sputum	+	+	+
401	Stuhl	+	+	+
409	Sputum	+	-	-
417	Sputum	+	+	+
421	Sputum	+	+	+
422	Wund- abstrich	+	+	+
445	Sputum	+	+	-
446	Sputum	+	+	+
452	Vaginal- abstrich	+	+	+
479	Sputum	+	+	-
480	Sputum	+	+	+
481	Sputum	+	+	+
486	Sputum	+	+	+
489	Sputum	+	+	+
500	Sputum	+	+	+
504	Bronch.- abstrich	+	+	-
508	Blut	+	+	+
533	Sputum	+	+	+
543	Blut	+	+	+
544	Blut	+	+	-
545	Blut	+	+	+
546	Sputum	+	+	+

Tabelle 2

Wachstumsvergleich bei C. albicans CBS 2730 im
Proteolyse-Kulturfiltrat von C. albicans CBS 2730
und in Sabouraud-Dextrose-Lösung

Bebrütungs- zeit 26°C	Wachstum von C. albicans CBS 2730 Zellen/ml in		
	Proteolyse- Kulturfiltrat Ausgangs- pH 3,5	Sabouraud- Dextrose- Lösung Ausgangs- pH 3,5	Sabouraud- Dextrose- Lösung Ausgangs- pH 6,0
0 Std.	$1,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$
5 Std.	$1,4 \times 10^2$	$0,5 \times 10^2$	$0,7 \times 10^2$
10 Std.	$7,0 \times 10^2$	$7,1 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$
24 Std.	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$
48 Std.	$7,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$4,8 \times 10^6$

2. Die Wirkung von Nystatin gegen C. albicans in
flüssigen Nährmedien

1. Die Wirksamkeit von Nystatin gegen C. albicans
in Sabouraud-Dextrose-Lösung (Ausgangs-pH 6,0)
und in Proteolyse-Kulturfiltrat von C. albicans
CLS 2730 (Ausgangs-pH 3,5)
(Röhrchenverdünnungstest)

Im herkömmlichen Nähr- und Prüfsubstrat Sabouraud-Dextrose-Lösung mit dem Ausgangs-pH-Wert 6,0 lag nach 96-stündiger Beobachtungszeit die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Nystatin zwischen 25 und 50 E/ml. Im Proteolyse-Kulturfiltrat mit Ausgangs-pH 3,5, d.i. das pH-Optimum der Proteolyse, erhöhte sich deutlich die MHK. Bei 8 Stämmen lag die MHK bei >100 E/ml (s. Tab. 3a und 3b).

2. Die Wirksamkeit von Nystatin gegen C. albicans
in Sabouraud-Dextrose-Lösung (Ausgangs-pH 3,5)
und in Proteolyse-Kulturfiltrat von C. albicans
CLS 2730 (Ausgangs-pH 3,5)

Aus der zusammenfassenden Darstellung in Tab. 4 geht deutlich die Herabsetzung der Wirkung von Nystatin in Proteolyse-Kulturfiltrat hervor. Daß die Wirkung von Nystatin durch die Wasserstoffionenkonzentration von pH 3,5 nicht beeinträchtigt wird, bestätigt die normale Wirksamkeit von Nystatin in Sabouraud-Dextrose-Lösung mit Ausgangs-pH 3,5, denn bei 29 von 30 Stämmen lag hierbei die MHK bei 25 E/ml Nystatin.

3. Die Wirksamkeit von Nystatin gegen C. albicans
in Sabouraud-Dextrose-Lösung (Ausgangs-pH 6,0)
und in Proteolyse-Kulturfiltrat von C. albicans
CBS 2730 (Ausgangs-pH 6,0)

Im Proteolyse-Kulturfiltrat mit Ausgangs-pH 6,0 zeigte Nystatin eine höhere Wirksamkeit als in Sabouraud-Dextrose-Lösung mit demselben Ausgangs-pH-Wert. Bei 16 von 30 Stämmen lag im Proteolyse-Kulturfiltrat mit Ausgangs-pH 6,0 die MHK bei 12,5 E/ml Nystatin (s. Tab. 5).

Tabelle 3a

Die Wirkung von Nystatin gegen C. albicans

(nach 96 Std./26°C)

C.albicans Stamm Nr.	Sabouraud-Dextrose- Lösung Ausgangs-pH 6,0 Konzentration von Nystatin E/ml					Proteolyse-Kultur- filtrat Ausgangs-pH 3,5 Konzentration von Nystatin E/ml				
	6,25	12,5	25	50	100	6,25	12,5	25	50	100
40	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
62	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
64	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
176	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
229	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
243	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
256	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
279	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
284	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
285	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
286	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
288	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
289	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
301	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
310	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
316	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
321	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
323	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
329	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
336	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
338	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
364	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
376	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
377	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
380	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-

Tabelle 3b

Die Wirkung von Nystatin gegen C. albicans

(nach 96 Std./26°C)

C.albicans Stamm Nr.	Sabouraud-Dextrose- Lösung Ausgangs-pH 6,0 Konzentration von Nystatin E/ml					Proteolyse-Kultur- filtrat Ausgangs-pH 3,5 Konzentration von Nystatin E/ml				
	6,25	12,5	25	50	100	6,25	12,5	25	50	100
388	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
393	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
394	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
400	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
401	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
409	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
417	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
421	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
422	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
445	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
446	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
452	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
479	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
480	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
481	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
486	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
489	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
500	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
504	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
508	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
533	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
543	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
544	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
545	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
546	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

Tabelle 4

Die Wirkung von Nystatin gegen C. albicans

(nach 96 Std./26°C)

C.albicans Stamm Nr.	Sabouraud-Dextrose- Lösung					Proteolyse-Kultur- filtrat				
	Ausgangs-pH 3,5 Konzentration von Nystatin E/ml					Ausgangs-pH 3,5 Konzentration von Nystatin E/ml				
	6,25	12,5	25	50	100	6,25	12,5	25	50	100
40	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
64	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
170	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
229	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
243	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
279	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
284	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
286	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
301	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
323	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
329	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
336	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
338	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
376	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
378	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
380	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
386	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
393	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
394	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
400	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
401	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
409	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
417	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
421	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
445	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
479	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
500	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
543	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
545	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
546	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-

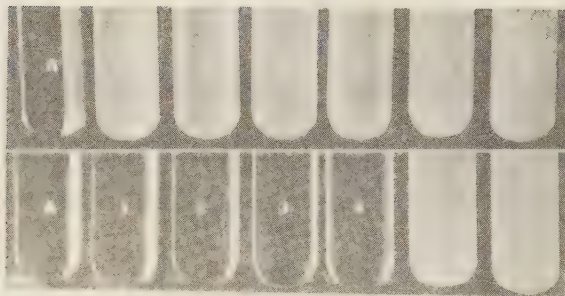
Tabelle 5

Die Wirkung von Nystatin gegen C. albicans

(nach 96 Std./26°C)

C.albicans Stamm Nr.	Sabouraud-Dextrose- Lösung Ausgangs-pH 6,0 Konzentration von Nystatin E/ml					Proteolyse-Kultur- filtrat Ausgangs-pH 6,0 Konzentration von Nystatin E/ml				
	6,25	12,5	25	50	100	6,25	12,5	25	50	100
40	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
64	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
178	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
229	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
243	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
279	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
284	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
286	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
301	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
323	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
329	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
336	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
338	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
376	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
378	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
380	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
388	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
393	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
394	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
400	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
401	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
409	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
417	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
421	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
445	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
479	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
500	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
543	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
545	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
546	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-

Abbildung 5



Verhalten von C. albicans M 40 in
Sabouraud-Dextrose-Lösung mit
Ausgangs-pH 3,5 (untere Reihe)
und in Proteolyse-Kulturfiltrat
mit Ausgangs-pH 3,5 (obere Reihe)
gegen Nystatin.

Beurteilung nach 96 Std./26°C.

von links nach rechts:

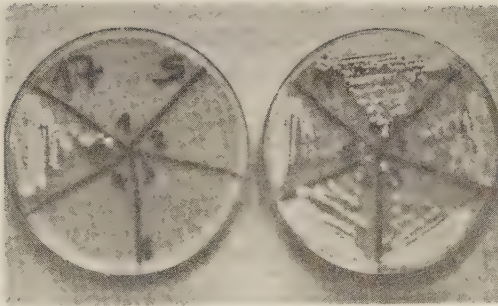
Röhrchen A = Nährbodenkontrolle
ohne Nystatin und
unbeimpft

Röhrchen 1-5 = entsprechen Nystatin-
Konzentrationen 100,
50, 25, 12,5, 6,25 E/ml

Röhrchen B = Nährbodenkontrolle
ohne Nystatin, beimpft

Im Bild: Darstellung der Wirkungsmin-
derung von Nystatin gegen C. albicans
im nativen Proteolyse-Kulturfiltrat
(pH 3,5) gegenüber der Wirkung in
Sabouraud-Dextrose-Lösung (pH 3,5).

Abbildung 6



Beispiel einer Kontrolluntersuchung der Befunde im Röhrchenverdünnungstest mit Hilfe der Abimpfung auf Sabouraud-Dextrose-Agar (C. albicans C 17).

Im Bild:

links:

Ergebnis der Abimpfung aus der Verdünnungsreihe in Sabouraud-Dextrose-Lösung, Ausgangs-pH 3,5 (Konzentrationen 1-5 siehe Abbildung 5).

rechts:

Ergebnis der Abimpfung aus der Verdünnungsreihe in Proteolyse-Kulturfiltrat (AusgangspH 3,5).

Beachte: Wachstumshemmung durch Nystatin in Sabouraud-Dextrose-Lösung, keine Wachstumshemmung durch Nystatin im Proteolyse-Kulturfiltrat.

Foto: Durchmesser der Petrischale 82 mm.

IV. Diskussion

Die einleitend gestellte Frage, inwieweit die in vitro nachweisbare Proteolyse bei C. albicans auch in vivo abläuft, wurde über frühere experimentelle Untersuchungen (43, 49) hinaus von GROSSE und STAIB (18) weiter verfolgt. Hierbei konnte festgestellt werden, daß ein C. albicans Stamm zum Zeitpunkt der stärksten Proteolyseaktivität intraperitoneal an weiße Mäuse verabreicht, einen septischen Verlauf verursacht, der mit demselben Stamm nach herkömmlicher Züchtung auf Sabouraud-Dextrose-Agar nicht zur Ausbildung gebracht werden konnte. Aufgrund der Tatsache, daß hierbei schon 24 Std. post injectionem bei den septischen Herden in den parenchymatösen Organen neben sich vermehrenden Zellen in der Hefephase eine deutliche Eiweißfällung vorliegt, der später eine Zerstörung histologischer Strukturen folgt, muß angenommen werden, daß es sich hierbei um Aktivitäten handelt, die der Eiweißfällung und Proteolyse in vitro entsprechen (s. hierzu Abb. 1 und 2). Erneut wurde hierbei bestätigt, daß die hohe enzymatische Aktivität von C. albicans im ca. 24 Std. alten Granulom mit der Hefephase gekoppelt ist, d.h. mit derselben morphologischen Zustandsform, in der C. albicans optimal proteolysiert. Die Myzel- bzw. Pseudomyzelbildung konnte hierbei nur im nekrotischen Gewebe festgestellt werden (49); auffallend ist, daß im Agargel die Myzelphase vorzugsweise im proteolysierten Substrat zur Ausbildung kommt (40) (s. hierzu Abb. 3 und 4). Diese lichtmikroskopischen Befunde wären somit auch eine Bestätigung elektronenoptischer

Beobachtungen von MONTES und WILBORN, die im Excisionsmaterial von der Mundschleimhaut eines Patienten, der das Bild einer oralen Candidamykose bot, strukturelle Veränderungen des Gewebes um die Pilzzellen herum vorfanden, die als mögliche Proteolyse diskutiert wurden (31). Auch VOGT fand bei seinen jüngsten elektronenmikroskopischen Untersuchungen strukturlose Höfe um Sproßzellen in Gewebe (54).

Aufgrund dieser morphologischen Variabilität (19, 27, 28) von C. albicans, gekoppelt mit bestimmten enzymatischen Aktivitäten, stellt sich zwangsläufig die Frage, ob die für therapeutische Zwecke gewünschte Wachstumshemmung durch eine Substanz unter derartigen Veränderungen des Milieus und der Stoffwechsellage des Erregers beeinflußt werden kann. Mit Hilfe eines Vertreters der Polyen-Antibiotica, und zwar Nystatin, sollte diese Frage untersucht werden.

Nystatin ist als Lokalantimycoticum in der Bundesrepublik Deutschland und West-Berlin unter dem Namen Moronal im Handel. Es ist ein Polyen, das aus dem Kulturfiltrat von Streptomyces noursei gewonnen wird. Es wirkt wachstumshemmend auf die verschiedenartigsten pathogenen Pilze, unter ihnen auch C. albicans (9, 10, 55). Nystatin wird an die Zellwand von C. albicans gebunden und verändert die Permeabilität der Zellmembran, wobei der Einstrom von Glucose in die Zellen nicht behindert werden soll (21, 24, 55). Es hemmt die

aerobe und anaerobe Glycolyse in der Zelle und greift so in die endogene Atmung ein (17, 23). SCHOLER sieht die Wirkung der Polyene vorwiegend als Membranschädigung, die er auf einen Ionenverlust der Zellen zurückführt (36). Die Wirkung von Nystatin soll angeblich herabgesetzt werden durch Magnesium- und Kalziumionen, Fettsäuren, Cystein, Glutathion, Natriumthioglycolat, Glucose, Maltose, Lactose, Phosphatpuffer, Gallensalze und Serum (8, 16, 22, 30, 32, 35, 55, 58, 59).

Nachdem sich unsere Untersuchungen mit der Beeinflussung der Nystatinwirkung unter Substratbedingungen, wie sie bei der Proteolyse vorliegen, befassen, mußten die auf ihre Empfindlichkeit gegen Nystatin zu prüfenden Stämme auch auf ihre eigene Proteolyseaktivität untersucht werden (s. hierzu Abb. 1-4 und Tab. 1a und 1 b). Hierbei wurde erneut bestätigt, daß frisch isolierte Stämme aus verschiedensten Bereichen des menschlichen Körpers über die Fähigkeit der Eiweißfällung und Proteolyse verfügen (46, 50). Nur bei 2 von 50 Stämmen konnte nach 10-tägiger Beobachtungszeit keine Proteolyseaktivität festgestellt werden.

Auf den Nährwert von Proteolyse-Kulturfiltrat von C. albicans Stämmen für C. albicans und verschiedene Bakterienarten wurde von STAIB sowie STAIB und GEIER hingewiesen (43, 44, 48). Eine einwandfreie Analyse des Proteolyse-Kulturfiltrats wäre nach FASOLD aufgrund der Vielzahl verschie-

dener Peptidverbindungen (ca. 200) nur mit größtem Aufwand möglich (12). Die Dextrose-Konzentration des Proteolyse-Kulturfiltrates liegt um 0,8 % (12). Wie auch im Rahmen der vorliegenden Prüfungen nachgewiesen wurde, ist der Nährwert des Proteolyse-Kulturfiltrates z.B. von C. albicans CBS 2730 für diesen Stamm annähernd gleichwertig mit dem der Sabouraud-Dextrose-Lösung. Eine biologische Verschiedenartigkeit dieser beiden Nährsubstrate kommt aber deutlich durch die differenten Wirkungsabläufe von Nystatin auf die geprüften C. albicans Stämme zum Ausdruck (s. hierzu Abb. 5 und 6).

Unsere erste grundsätzliche Frage lautete: wie wirkt Nystatin im Proteolyse-Kulturfiltrat mit Ausgangs-pH-Wert 3,5, d.h. in einem Substrat und in einem pH-Bereich, wie sie sich bei optimaler Proteolyse finden? Wie festgestellt werden konnte, wird im Proteolyse-Kulturfiltrat mit dem Ausgangs-pH-Wert 3,5 bei einem Großteil der Stämme die minimale Hemmkonzentration (MHK) deutlich erhöht. Unverkennbar geht aus den Tabellen 3a, 3b und 4 hervor, daß es sich hierbei um keine einheitliche Verschiebung der MHK, sondern um stammspezifische Verschiebungen handelt, die somit auf keine etwaige Inaktivierung von Nystatin schließen lassen. Dieses sei anhand folgender Beispiele belegt: die beiden Stämme C. albicans M 64 und C. albicans M 316, aus Sputum isoliert, zeigten eine verschiedene Verhaltensweise gegen Nystatin im Proteolyse-Kulturfiltrat. Während der Stamm C. albicans M 316 im Proteolyse-Kulturfiltrat

mit dem Ausgangs-pH-Wert 3,5 und in Sabouraud-Dextrose-Lösung mit dem Ausgangs-pH-Wert 6,0 über dieselbe Empfindlichkeit gegen Nystatin verfügte, zeigte der Stamm C. albicans M 64 dieselbe MHK wie der Stamm C. albicans M 316 in Sabouraud-Dextrose-Lösung, im Proteolyse-Kulturfiltrat dagegen stieg die MHK bis über 100 E/ml.

Damit wird deutlich zum Ausdruck gebracht, daß die zur Diskussion stehenden Proteolyseprodukte nicht direkt auf das Nystatin wirken, sondern auf den zu prüfenden C. albicans Stamm; denn das Substrat, d.h. das Proteolyse-Kulturfiltrat einschließlich der jeweiligen Nystatin-Konzentration ist für sämtliche Stämme gleich. Diese Vermutung wird gestützt durch die stammspezifische Verhaltensweise von C. albicans gegen Eiweiß, d.h. Fällung und Proteolyse (40). Diese Stammspezifität konnte auch im Rahmen unserer vorliegenden Untersuchungen bei der Herstellung von Proteolyse-Kulturfiltrat einzelner Stämme bestätigt werden, deren Nährwert für bekannte Stämme sehr variierte (23).

Da das Reduktionsäquivalent des Proteolyse-Kulturfiltrats nach FASOLD (12) nicht das des Glucosegehalts von 0,8 % überstieg, sehen wir keine Beziehung zwischen den Befunden anderer Autoren über die Inaktivierung von Polyenantibiotica durch reduzierende Substanzen und der Wirkungsminde- rung von Nystatin im Proteolyse-Kulturfiltrat (8, 56).

Die Vermutung, daß der pH-Wert 3,5 ungünstig auf Nystatin wirke, konnte nicht bestätigt werden, denn in Sabouraud-Dextrose-Lösung mit Ausgangs-pH-Wert 3,5 konnten die niedrigsten MKK-Werte von Nystatin erzielt werden. Inwieweit gerade diese Beobachtung auf Ergebnisse von Stoffwechseluntersuchungen anderer Autoren übertragbar ist, müßte geprüft werden (5). So wurde u.a. festgestellt, daß bei niedrigem pH-Wert mehr Nystatin an die Zellmembran gebunden wird und dementsprechend die Hemmung der Glykolyse rascher in Erscheinung tritt (6, 23, 24).

Die Behauptung, daß Phosphatpuffer eine Wirksamkeitsminderung von Nystatin verursache, konnte unsererseits nicht bestätigt werden (4, 55).

Die stammspezifische Verhaltensweise hinsichtlich der Aktivität gegen Eiweiß kam auch bei der Untersuchung der in vorliegender Studie verwandten Stämme auf Serum-Protein-Agar deutlich zum Ausdruck. So wurde festgestellt, daß von 48 proteolysierenden Stämmen 15 Stämme noch nach 10-tägiger Beobachtungszeit in der Hefephase blieben (s. hierzu Tab. 1a und 1 b), d.h. in der morphologischen Zustandsform, die für die Proteolyse in vitro und in vivo verantwortlich gemacht wird (18, 43, 46). Demzufolge wird bei diesen Stämmen durch ihre eigenen Proteolyseprodukte kein Übergang von der Hefephase in die Myzelphase ausgelöst, was bei der Mehrzahl bisher geprüfter Stämme als die Regel gilt (40, 46, 49).

Aufgrund dieser differenten morphologischen Verhaltensweise gegen Proteolyseprodukte ist demzufolge auch mit einer begrenzt stammspezifischen Verhaltensweise gegenüber Nystatin unter diesen Substratbedingungen zu rechnen. Bisherige Stoffwechseluntersuchungen anderer Autoren über die Wirkung von Nystatin bei C. albicans lassen sich deshalb kaum mit vorliegenden Befunden vergleichen (4, 5, 6, 10, 15), einerseits wegen der verschiedenartigen Wirksamkeit von Nystatin bei im Proteolyse-Kulturfiltrat sich vermehrenden C. albicans Zellen und andererseits wegen der stammspezifischen Verhaltensweise der geprüften Stämme. Die Feststellung, daß im Proteolyse-Kulturfiltrat mit Ausgangs-pH 6,0 fast noch eine stärkere Wachstumshemmung durch Nystatin vorliegt als in Sabouraud-Dextrose-Lösung, ist nicht nur in theoretischer sondern ganz besonders in praktischer, d.h. therapeutischer Sicht von Interesse.

Wie bereits früher von STAIB festgestellt, kann die Pufferkapazität eines Substrates den Pilz an der Einstellung des für die Proteolyseaktivität obligaten pH-Wertes, hier 3,5, hindern und damit eine Proteolyse unterbinden (42). Ein ähnliches Prinzip kann somit auch nach abgelaufener Proteolyse hinsichtlich der Wirkung der Proteolyseprodukte und ihrem Einfluß auf die Empfindlichkeit des Erregers gegen Nystatin in Erscheinung treten. Da anzunehmen ist, daß außerhalb der aktiven Proteolysebereiche im Gewebe und Agar-

gel höhere pH-Werte vorliegen, muß hier mit einer ungestörten Empfindlichkeit von C. albicans gegen Nystatin gerechnet werden. Welche Bedeutung den Beobachtungen in vitro über den Einfluß von bestimmten Nystatin-Konzentrationen auf den Dimorphismus von C. albicans zukommt, muß weiter verfolgt werden (7, 57). Ungeachtet der zu erwartenden Komplexität von Faktoren, die an der Wirksamkeitsminderung von Nystatin in diesem Milieu beteiligt sind, sollte diesen Bedingungen bei künftigen entsprechenden Stoffwechseluntersuchungen besondere Beachtung geschenkt werden.

Diese Stellungnahme erfuhr eine Bestätigung durch die jüngsten Beobachtungen von TÓTH und PÁLÓS, die nicht nur die stammspezifische Proteolyseaktivität von C. albicans für die Pathogenese der C. albicans Mykose im Vaginalbereich der Frau verantwortlich machen, sondern hierin auch mit großer Wahrscheinlichkeit die Ursache der Therapieresistenz sehen. Bei den Fällen mit stark proteolysierenden C. albicans Stämmen fanden sie auffälligste Therapieresistenz (52).

Zusammenfassend wurde anhand der gewählten Untersuchungsmethode festgestellt, daß bei der Proteolyse von C. albicans, die gegenwärtig als ein mögliches Pathogenitätskriterium gilt, Substanzen anfallen, die die herkömmliche wachstumshemmende Wirkung von Nystatin bei C. albicans beeinflussen können.

Ob die erhobenen Befunde eine Erklärung sind für die eingangs gestellte Frage über die Therapieresistenz bei gleichzeitiger Empfindlichkeit des Keims in vitro, müssen weitere Untersuchungen, besonders in Anlehnung an die diskutierten Beobachtungen klären.

V. Zusammenfassung

1. Für vorliegende Untersuchungen dienten 50 C. albicans Stämme, aus Sputum (33), Hautabstrich (9), Blut (4), Vaginalabstrich (2), Bronchialsekret (1) und Stuhl (1) isoliert und nach der Methode von LODDER und KREGER-VAN RIJ identifiziert.
2. Vor der Empfindlichkeitsprüfung gegen Nystatin wurden sämtliche C. albicans Stämme auf ihre Aktivität gegen Eiweiß unter besonderer Berücksichtigung der Eiweiß-fällung und Proteolyse im Serum-Protein-Agar pH 5,0 geprüft. In diesem Zusammenhang wurde auch auf das dimorphe Verhalten von C. albicans geachtet.

Innerhalb einer Beobachtungszeit von 10 Tagen/26°C zeigten 48 von 50 Stämmen die Fähigkeit zur Proteolyse im Agargel. Die beiden nicht proteolysierenden Stämme verursachten Eiweißfällung. Die Proteolyse wurde stets durch die Hefephase, d.h. rund-oval sprossende Zellen verursacht. Bei 35 Stämmen erfolgte innerhalb der Beobachtungszeit von 10 Tagen nach abgelaufener Proteolyse eine morphologische Veränderung, d.h. Myzel- und Pseudomyzelbildung.

3. Die bekannte Wirksamkeit von Nystatin im herkömmlichen Nähr- und Prüfmedium für C. albicans, d.i. Sabouraud-Dextrose-Lösung mit Ausgangs-pH-Wert 6,0, wurde bei

sämtlichen geprüften Stämmen bestätigt (durchschnittliche MHK 12,5-25 E/ml). Im Proteolyse-Kulturfiltrat - zum Zeitpunkt der stärksten Proteolyseaktivität (pH 3,5) von C. albicans Stamm CBS 2730 gewonnen - wurde die Wirksamkeit von Nystatin von Stamm zu Stamm variierend deutlich herabgesetzt. Bei 8 von 50 Stämmen lag die MHK bei $\geq$ 100 E Nystatin/ml.

4. Anhand der vergleichenden Prüfung der Nystatinwirkung in Sabouraud-Dextrose-Lösung und Proteolyse-Kulturfiltrat mit dem Ausgangs-pH-Wert 3,5 konnte festgestellt werden, daß die Wirksamkeitsminderung von Nystatin nicht auf den pH-Wert 3,5, wie er bei der Proteolyse vorliegt, zurückzuführen ist; denn die Wachstumshemmung in Sabouraud-Dextrose-Lösung wurde durch die pH-Veränderung von 6,0 auf 3,5 noch verstärkt. Bei 27 von 35 Stämmen lag die MHK bei 25 E Nystatin/ml.

5. Die vorliegende Untersuchung der Nystatinwirkung in den beiden Medien mit dem Ausgangs-pH-Wert 6,0 erbrachte eine stärkere wachstumshemmende Wirkung von Nystatin im Proteolyse-Kulturfiltrat. Hierbei lag bei 16 von 35 Stämmen die MHK bei 12,5 E Nystatin/ml.

Insgesamt wurde festgestellt, daß bei der Proteolyse Substanzen anfallen, die bei dem pH-Wert 3,5 die Wirksamkeit von Nystatin herabsetzen und u.U. aufheben können.

nen. Eine Erklärung für die Verstärkung der hemmenden Wirkung von Nystatin im Proteolyse-Kulturfiltrat bei pH 6,0 steht noch aus.

6. Der mögliche störende oder aktivierende Einfluß von Endprodukten der Proteolyse von C. albicans auf die wachstumshemmende Wirkung von Nystatin gegen diese Sproßpilzart wurde unter Berücksichtigung der Beobachtung anderer Autoren diskutiert.

VI. Literaturverzeichnis

1. AHEARN, D.G., MEYERS, S.P. and NICHOLS, R.A.: EXTRACELLULAR PROTEINASES OF YEASTS AND YEASTLIKE FUNGI. Appl. Microbiol. 16, 1968, 1370-1374
2. BLASCHKE-HELLMESSEN, R.: EPIDEMIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM VORKOMMEN VON HEFE-PILZEN BEI KINDERN UND DEREN MÜTTERN. Mykosen 11, 1968, 611-616
3. BOUDRU, I.: DE LA RÉSISTANCE DES CANDIDA ALBICANS A LA NYSTATINE. J. Pharm. Belg. 1969, 162-185
4. BRADLEY, S.G.: INTERACTIONS BETWEEN PHOSPHATE AND NYSTATIN IN CANDIDA STELLATOIDEA. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 98, 1958, 786-789
5. BRADLEY, S.G. and FARBER, P.J.: INTERACTIONS AMONG pH, BUFFER AND NYSTATIN IN CANDIDA STELLATOIDEA. Antibiot. and Chemother. 10, 1960, 171-179
6. BRADLEY, S.G., FARBER, P.J. and JONES, L.A.: ACTION OF POLYENE ANTIBIOTICS ON CANDIDA. Antimicrobial Agents Annual, 1961, 558-569
7. BULYK, H., BORON-KACZMARSKA, A. and BORCOWSKI, J.: STUDIES ON THE EFFECT OF NYSTATIN ON MYCELIAL TRANSFORMATION OF CANDIDA ALBICANS CELLS IN THE HUMAN SERUM. Med. Dosw. Mikrobiol. 23, 1971, 175-181
8. DONOVICK, R., PANSY, F.E., STOUT, H.A., STANDER, H., WEINSTEIN, M.J. and GOLD, W.: SOME IN VITRO CHARACTERISTICS OF NYSTATIN (MYCOSTATIN). In: Therapy of Fungus Diseases. An International Symposium. Ed. Th. H. Sternberg and V. D. Newcomer. Little, Brown and Company, Boston Toronto, 1955, 176-185
9. DROUHET, E.: THERAPEUTIC ACTIVITY OF NYSTATIN (MYCOSTATIN) IN CANDIDA INFECTIONS. In: Therapy of Fungus Diseases. An International Symposium. Ed. Th. H. Sternberg and V. D. Newcomer. Little, Brown and Company, Boston Toronto, 1955, 211-218

10. DROUHET, E.,
HIRTH, L. and
LEBEURIER, G.: SOME ASPECTS OF THE MODE OF
ACTION OF POLYENE ANTIFUNGAL
ANTIBIOTICS.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 89, 1960,
134-155

11. DUTCHER, J.D.,
WALTERS, D.R. and
WINTERSTEINER, O.P.: STUDIES OF THE CHEMICAL PRO-
PERTIES AND STRUCTURE OF NY-
STATIN (MYCOSTATIN).
In: Therapy of Fungus Diseases.
An International Symposium.
Ed.Th.H. Sternberg and
V.D. Newcomer. Little, Brown
and Company, Boston Toronto,
1955, 168-175

12. FASOLD, H.: PERSÖNLICHE MITTEILUNG, 1971

13. FASOLD, H.,
REMOLD, H. und
STAIB, F.: ANREICHERUNG UND CHARAKTERISIE-
RUNG EINES PROTEOLYTISCHEN EN-
ZYMS AUS CANDIDA ALBICANS.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.
348, 1967, 1225-1251

14. GEIER, R.: ZUM WACHSTUM VON STAPHYLOCOCCUS
AUREUS IM PROTEOLYSE-KULTURFIL-
TRAT VON CANDIDA ALBICANS.
Inaugural-Dissertation, Freie
Universität Berlin, 1971

15. GERKE, J.R. and
MADIGAN, M.E.: AMPHOTERICIN B AND OTHER POLY-
ENE ANTIFUNGAL ANTIBIOTICS:
PHOTOMETRIC ASSAY AND FACTORS
INFLUENCING ACTIVITY.
Antibiot.and Chemother. 11,
1961, 227-237

16. GOLD, W.,
STANDER, H. and
PANSY, F.E.: ASSAY METHODS FOR NYSTATIN.
Antibiot.Ann. 1953-1954,
195-198

17. GOTTLIEB, D.,
CARTER, H.E.,
SLONEKER, J.H. and
AMMANN, A.: PROTECTION OF FUNGI AGAINST
POLYENE ANTIBIOTICS BY STEROLS.
Science 128, 1958 II, 361

18. GROSSE, G. und
STAIB, F.: ZUR EXPERIMENTELLEN CANDIDA
ALBICANS-SEPSIS BEI DER MAUS.
10.Wissenschaftliche Tagung
der Deutschsprachigen Mykolo-
gischen Gesellschaft, Krefeld,
1973

19. HURLEY, R. and
STANLEY, V.C.: CYTOPATHIC EFFECTS OF PATHOGE-
NIC AND NONPATHOGENIC SPECIES
OF CANDIDA ON CULTURED MOUSE
EPITHELIAL CELLS: RELATION TO
THE GROWTH RATE AND MORPHOLOGY
OF THE FUNGI.
J.Med.Microbiol.2, 1969, 63-74

20. KAPICA, L. and BLANK, F.: GROWTH OF CANDIDA ALBICANS ON KERATIN AS SOLE SOURCE OF NITROGEN.
Dermatologica (Basel) 115, 1957, 81-105
21. LAMPEN, J.O. and ARNOW, P.: SIGNIFICANCE OF NYSTATIN UPTAKE FOR ITS ANTIFUNGAL ACTION.
Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 101, 1959, 792-797
22. LAMPEN, J.O., ARNOW, P.M. and SAFFERMAN, R.S.: MECHANISM OF PROTECTION BY STEROLS AGAINST POLYENE ANTIBIOTICS.
J.Bact. 80, 1960, 200-206
23. LAMPEN, J.O., MORGAN, E.R. and SLOCUM, A.: EFFECT OF NYSTATIN ON THE UTILIZATION OF SUBSTRATES BY YEAST AND OTHER FUNGI.
J.Bact. 74, 1957, 297-302
24. LAMPEN, J.O., MORGAN, E.R., SLOCUM, A. and ARNOW, P.: ABSORPTION OF NYSTATIN BY MICROORGANISMS.
J.Bact. 78, 1959, 282-289
25. LODDER, J. and KREGER-VAN RIJ, N.J.W.: THE YEASTS.
North Holland Publ.Comp., Amsterdam/Holland, 1952
26. MALE, O. and NESVADBA, H.: STUDIES ON PROTEOLYTIC ACTIVITIES OF A SERIES OF YEASTS BY MEANS OF AMINOACID- β -NAPHTHYLAMIDESUBSTRATES.
Antonie v. Leeuwenhoek 35, Suppl. Yeast Symposium, 1969
27. MARDON, D., BALISH, E. and PHILIPPS, A.W.: CONTROL OF DIMORPHISM IN A BIOCHEMICAL VARIANT OF CANDIDA ALBICANS.
J.Bact. 100, 1969, 701-707
28. MASSHOFF, W. und ADAM, W.: HISTOMORPHOLOGIE DER EXPERIMENTELLEN CANDIDA-INFEKTION.
Arch.klin.exp.Derm. 204, 1957, 416-447
29. MEINHOF, W.: DIE THERAPIE DER CANDIDA-MYKOSEN.
Therapiewoche 23, 1973, 1667-1673
30. MEYER-ROHN, J., HOPFF, W. und LANGE-BROCK, Th.: EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER WIRKUNGSWEISE UND THERAPEUTISCHE EFFEKTE VON NYSTATIN.
Arzneimittel-Forsch. 7, 1957, 335-357

31. MONTES, L.F. and WILBORN, W.H.:
ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF
HOST-PARASITE RELATIONSHIP
IN ORAL CANDIDIASIS.
J.Bact. 96, 1968, 1349-1356
32. PAGANO, J.F. and
STANDER, H.:
BIOASSAY OF NYSTATIN (MYCOSTA-
TIN) IN BODY FLUIDS.
In: Therapy of Fungus Diseases.
An International Symposium.
Ed. Th.H. Sternberg and
V.D. Newcomer. Little, Brown
and Company, Boston Toronto,
1955, 186-194
33. PATEL, P.V. and
JOHNSTON, J.R.:
DOMINANT MUTATION FOR NYSTATIN
RESISTANCE IN YEAST.
Appl. Microbiol. 16, 1968,
164-165
34. REMOLD, H.,
FASOLD, H. and
STAIB, F.:
PURIFICATION AND CHARACTERIZA-
TION OF A PROTEOLYTIC ENZYME
FROM CANDIDA ALBICANS.
Biochim. biophys. Acta (Amst.),
167, 1968, 399-406
35. SCHNEIERSOHN, S.St.,
AMSTERDAM, D. and
LITTMAN, M.L.:
INACTIVATION OF AMPHOTERICIN
B, CHLORQUINALDOL, GENTIAN
VIOLET AND NYSTATIN BY BILE
SALTS.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 99,
1968, 241-244
36. SCHOLER, H.J.:
CHEMOTHERAPIE VON MYKOSEN DER
INNEREN ORGANE.
Schweiz. med. Wsch. 98, 1968,
602-611
37. GERNAGHI, G.:
ZUR SPROSSPILZFLORA KRANKHAFT
VERÄNDERTER HAUT UND SCHLEIM-
HAUT.
Derm. Mschr. 155, 1969, 487-496
38. SQUIBB INSTITUTE
FOR MEDICAL RESEARCH:
MYCOSTATIN (SQUIBB NYSTATIN).
A GENERAL SUMMARY OF CLINICAL
AND PHARMACOLOGICAL INFORMATION,
CHIEFLY, CONCERNING AN ANTIFUN-
GAL ANTIBIOTIC DERIVED FROM
STREPTOMYCES NOURSEI.
New Brunswick, New Jersey, 1956
39. STAIB, F.:
SERUM-PROTEIN-AGAR pH 4,2 UND
5,0 FÜR SPROSSPILZE.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 195, 1964,
265-267
40. STAIB, F.:
SERUM-PROTEINS AS NITROGEN
SOURCE FOR YEASTLIKE FUNGI.
Sabouraudia 4, 1965, 187-193

41. STAIB,F.: DAS VERHALTEN VON CANDIDA ALBICANS- UND CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS-STÄMMEN GEGENÜBER HUMAN-SERUM-PROTEINEN. Mycopathologia (Den Haag) 26, 1965, 209-224
42. STAIB,F.: HUMAN-SERUM-ALBUMIN DECOMPOSITION BY CANDIDA ALBICANS, INFLUENCED IN VITRO. Recent advances of human and animal mycology. Publ. House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, 1967, 337-340
43. STAIB,F.: PROTEOLYSIS AND PATHOGENICITY OF CANDIDA ALBICANS STRAINS. Mycopathologia (Den Haag) 37, 1969, 345-348
44. STAIB,F.: NEUE GESICHTSPUNKTE ZUR BIOLOGIE DER CANDIDA ALBICANS. Arch.Derm.-Forsch. 244, 1972, 397-398.
45. STAIB,F.: PERSÖNLICHE MITTEILUNG, 1973
46. STAIB,F.,
ALTMANN,G.,
GEIER,R.,
GROSSE,G. and
SENSKA,M.: NEW ASPECTS OF THE BIOLOGY OF CANDIDA ALBICANS IN MAN. Second International Specialized Symposium on Yeasts, Tokyo, 1972, in press
47. STAIB,F., und
BLISSE,A.: ÜBER DIE WIRKUNG VON NYSTATIN (MORONAL) UND AMPHOTERICIN B GEGEN SPROBILZE IN VITRO. Im Druck, 1973
48. STAIB,F. und
GEIER,R.: PROTEOLYSIS PRODUCTS OF CANDIDA ALBICANS AS A SUBSTRATUM FOR GROWTH OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS. A PRELIMINARY REPORT. Zbl.Bakt.Hyg.I.Ab.Orig. A 218, 1971, 374-375
49. STAIB,F.,
GROSSE,G.,
BLISSE,A. and
SENSKA,M.: PROTEOLYSING CANDIDA ALBICANS STRAINS IN VITRO AND IN THE ANIMAL EXPERIMENT. Second International Specialized Symposium on Yeasts, Tokyo, 1972, in press
50. STAIB,F. und
GRÜHN,G.: ÜBER DIE WIRKUNG VON NYSTATIN GEGEN CANDIDA ALBICANS IM PROTEOLYSE-KULTURFILTRAT VON CANDIDA ALBICANS. Zbl.Bakt.Hyg.I.Ab.Orig. A 218, 1971, 369-373

51. STOUT, H.A. and
PAGANO, J.F. : RESISTANCE STUDIES WITH NYSTATIN.
Antibiot. Ann. 1955-1956, 704-710
52. TÓTH, B. und
PÁLOS, H. : BEDEUTUNG DER SPROSPILZMYKOSE
IN DER GEBURTSHILFLICH-GYNÄKO-
LOGISCHEN PRAXIS.
Zbl.Gynäk. 25, 1973, 470-477
53. VANBREUSEGHEM, R. : LES ANTIBIOTIQUES ANTIFONGIQUES.
Acta clin.belg. 18, 1963,
220-233
54. VOGT, W.H. : ELEKTRONEN-MIKROSKOPISCHE UNTER-
SUCHUNGEN ZUM VERHALTEN VON HE-
FEIPILZEN AM EPITHELIALEN GEWEBE.
10. Wissenschaftliche Tagung der
Deutschsprachigen Mykologischen
Gesellschaft, Krefeld, 1973
55. WALTER, A.M. und
HEILMEYER, L. : ANTIBIOTIKA-FIBEL.
3. Aufl., neu bearbeitet unter
Mitwirkung von Manfred Plempel
und Hinrich Otten, Georg Thieme-
Verlag, Stuttgart, 1969
56. WEIS, M.R. and
LEVINE, H.B. : INACTIVATION OF AMPHOTERICIN B
BY REDUCING AGENTS: INFLUENCES
ON GROWTH INHIBITION OF CANDIDA
ALBICANS AND LYSIS OF ERYTHRO-
CYTES.
Sabouraudia 10, 1972, 132-142
57. WINNER, D. and
ATHAR, M.A. : INDUCTION OF RESISTANCE TO POLY-
ENE ANTIBIOTICS IN CANDIDA SPE-
CIES.
X. Internat. Congress Microbiology,
Mexico, 1970
58. ZHDANOVICH, Yu. V.,
LOKSHIN, G.B. and
KUZOVKOV, A.D. : MECHANISM FOR INACTIVATION OF
POLYENE ANTIBIOTICS. IV. ISOLA-
TION AND IDENTIFICATION OF LOW
MOLECULAR INACTIVATION PRODUCTS
OF NYSTATIN.
Pharm. Chem. J. 1967, 215-218
59. ZYGMUNT, W.A. and
TAVORMINA, P.A. : STEROID INTERFERENCE WITH ANTI-
FUNGAL ACTIVITY OF POLYENE ANTI-
BIOTICS.
Appl. Microbiol. 14, 1966, 865-869

Herrn Professor Dr.med.,Dr.med.vet. F. S t a i b
danke ich herzlich für die Überlassung des Themas
und für seinen unermüdlichen Rat bei der Durchfüh-
rung der Dissertation.

Lebenslauf

Gudrun Ruth Altmann geb. Grünh

geboren: 1. Juli 1947 in Berlin-Spandau

Eltern: Studiendirektor Johannes Franz Grünh
und Ehefrau Ruth Martha Grünh geb. Sablotny

1954 Grundschulbesuch in der Birkenschule in
Berlin-Spandau

1958 Besuch der Ernst-Ludwig-Heim-Schule in
Berlin-Spandau

1960 Besuch des altsprachlichen Zweiges des
Kant-Gymnasium in Berlin-Spandau

1967 Ablegung der Reifeprüfung am Kant-Gymnasium in
Berlin-Spandau

1967 Immatrikulation im Fach Humanmedizin an der
Freien Universität Berlin

1972 Eheschließung mit Herrn Lutz Altmann

1973 Ablegung des medizinischen Staatsexamens an der
Freien Universität Berlin

seit 1973 Medizinalassistentin in Berlin

